

DIALOG(R)File 352:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012377722

WPI Acc No: 1999-183829/199916

XRAM Acc No: C99-053854

New heat-resistant ribonuclease H and its DNA - Useful as gene engineering and diagnostic reagent

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM CORP (MITU )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 11032772	A	19990209	JP 97198960	A	19970724	199916 B

Priority Applications (No Type Date): JP 97198960 A 19970724

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 11032772	A	J	7 C12N-015/09	

Abstract (Basic): JP 11032772 A

A DNA coding the protein (a) or (b): (a) a protein comprising amino acid sequence (2); and (b) a protein comprising amino acid sequence (2) in which at least one amino acid is deleted, replaced or added and having ribonuclease (RNase) H activity of the same heat resistance as the protein (a). Also claimed are: (1) a DNA coding a protein comprising amino acid sequence (2); a heat-resistant RNase H comprising the above protein (a) or (b); and (3) a heat-resistant RNase H consisting protein comprising amino acid sequence (2).

USE - The heat-resistant RNase H is useful as a gene engineering reagent and a diagnostic agent.

Dwg. 0/0

Title Terms: NEW; HEAT; RESISTANCE; RIBONUCLEASE; DNA; USEFUL; GENE; ENGINEERING; DIAGNOSE; REAGENT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07K-014/195; C12N-009/22;

C12N-015/09; C12R-001-01; C12R-001-19

File Segment: CPI

?

AE

AE

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-32772

(43) 公開日 平成11年(1999) 2月9日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/195		C 0 7 K 14/195	
C 1 2 N 9/22		C 1 2 N 9/22	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:01)			
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願平9-198960	(71) 出願人	00000:968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成9年(1997) 7月24日	(72) 発明者	金谷 茂則 大阪府箕面市粟生新家3-14-5
		(72) 発明者	春木 満 大阪府吹田市竹見台2-1-C7-403
		(74) 代理人	弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 耐熱性リボヌクレアーゼH及びそれをコードするDNA

(57) 【要約】

【課題】 耐熱性に優れたリボヌクレアーゼH及びそれをコードするDNAを得る。

【解決手段】 超好熱始原菌Pyrococcus sp. KOD1株より、リボヌクレアーゼ依存性温度感受性大腸菌変異株を宿主として利用するショットガンクローニング法を用いてリボヌクレアーゼH遺伝子をクローニングし、さらにリボヌクレアーゼHの大量発現系を構築する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(a)のタンパク質と同等の耐熱性のリボヌクレアーゼH活性を有するタンパク質

【請求項2】 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA。

【請求項3】 以下の(c)又は(d)の塩基配列を有する請求項1又は2に記載のDNA。

(c) 配列番号1に示す塩基配列における塩基番号181～864の塩基配列を有するDNA

(d) (c)のDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

【請求項4】 以下の(a)又は(b)のタンパク質からなる耐熱性リボヌクレアーゼH。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(a)のタンパク質と同等の耐熱性のリボヌクレアーゼH活性を有するタンパク質

【請求項5】 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質からなる耐熱性リボヌクレアーゼH。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、耐熱性リボヌクレアーゼH及びそれをコードするDNAに関する。

## 【0002】

【従来の技術】リボヌクレアーゼHは、DNA/RNAハイブリッドのRNA鎖のみを加水分解するので、cDNA合成の際の鋳型RNAの除去に利用される等、遺伝子工学用試薬として利用されている。また、リボヌクレアーゼHは、最近になって、遺伝子異常の診断法として注目されているサイクリングアプローブ法においても使用されるものである。

【0003】サイクリングアプローブ法は、両端がDNAで中央部がRNAでできているDNA-RNA-DNA鎖をアプローブとして用い、変異型DNAを検出する方法である。DNA-RNA-DNA鎖のRNA部分は、標的DNAの変異部分に相補的になるように作成されており、このアプローブをDNAサンプルと対合させる。リボヌクレアーゼHは、このアプローブと変異型DNAが2本鎖を形成したときはそのDNA/RNAハイブリッド領域を基質として認識しアプローブをRNA部分で切断する。一方、このアプローブが野生型DNAと2本鎖を形成したときにはDNA/RNAハイブリッドが完全には形成されないで、このアプローブはリボヌクレアーゼHに

より切断されない。従って、切断されたアプローブの断片を検出することによりDNAサンプル中に変異型DNAが存在するかどうかを調べることができる。変異型DNAの量がごく微量であったとしても、サーマルサイクラーにより一連の反応を繰り返せば、アプローブを何回でも切断できるので、アプローブ断片が蓄積することになり、結果としてその検出が可能となる。この方法では、サーマルサイクラーを用いるので、耐熱性リボヌクレアーゼHを使用することが極めて有利である。

【0004】耐熱性リボヌクレアーゼHとしては、高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来のものが知られている(Nucleic Acids Research, 19, 4443-4449(1991))。しかしながら、さらに耐熱性に優れたリボヌクレアーゼHが得られれば、サイクリングアプローブ法用試薬等として一層有用である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、耐熱性に優れたリボヌクレアーゼH及びそれをコードするDNAを得ることを課題とする。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、超好熱始原菌*Pyrococcus* sp. KOD1株より、リボヌクレアーゼH遺伝子をクローニングすることに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】すなわち本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA(以下、本発明DNAともいう)を提供する。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(a)のタンパク質と同等の耐熱性のリボヌクレアーゼH活性を有するタンパク質

【0008】本発明DNAは、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードする。本発明DNAとして、具体的には、上記(a)又は(b)のタンパク質をコードする以下の(c)又は(d)の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

(c) 配列番号1に示す塩基配列における塩基番号181～864の塩基配列を有するDNA

(d) (c)のDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

【0009】また、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質からなる耐熱性リボヌクレアーゼH(以下、本発明酵素ともいう)を提供する。

(a) 配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ(a)のタンパク質と同等の耐熱性のリボヌクレアーゼH活性を有するタンパク質

【0010】本発明酵素は、好ましくは、配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質からなる。Thermus thermophilus HB8等の好熱菌（高度好熱菌）の生育至適温度が80℃前後であるのに対し、超好熱菌の生育至適温度は90℃前後であるので、超好熱菌に由来する本発明酵素は、好熱菌由来のリボヌクレアーゼHよりも高い耐熱性を有することが期待される。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明DNAは、耐熱性に優れたリボヌクレアーゼH（以下、RNase Hともいう）、すなわち、以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする。  
（a）配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするDNA

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列から成り、かつ（a）のタンパク質と同等の耐熱性のRNase H活性を有するタンパク質

【0012】アミノ酸残基の置換、欠失又は挿入は、部位特異的突然変異などの公知の方法によって塩基配列にヌクレオチドの置換、欠失、挿入などの変異を導入することによって生じさせることができる。RNase H活性の測定方法及びその耐熱性の評価方法は公知であり（例えば、J. Biol. Chem. 266, 6038-6044(1991)及びJ. Biol. Chem. 267, 21535-21542(1992)参照）、この耐熱性のRNase H活性を実質的に害さない1以上のアミノ酸残基の置換、欠失又は挿入を当業者は容易に選択することができる。

【0013】好ましくは、（b）のタンパク質のアミノ酸配列は、（a）のタンパク質のアミノ酸配列と80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有する。また、タンパク質の構造の一部を、自然又は人工の突然変異によって耐熱性のRNase H活性を実質的に変えずに変化させることも可能である。本発明DNAのコードするタンパク質は、上記（a）のタンパク質の同種変異型に相当する構造を有するタンパク質も包含する。

【0014】本発明DNAの具体例としては、上記

（a）又は（b）のタンパク質をコードする以下の  
（c）又は（d）の塩基配列を有するDNAが挙げられる。

（c）配列番号1に示す塩基配列における塩基番号181～864の塩基配列からなるDNA

（d）このDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNA

【0015】ここでストリンジントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高い核酸同士、例えば完全にマッチしたハイブリッド

のT<sub>m</sub>から該T<sub>m</sub>より10℃低い温度までの範囲の温度、あるいは80%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低い核酸同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。

【0016】上述のように、RNase H活性の測定方法及びその耐熱性の評価方法は公知であり、上記（c）のDNAの塩基配列に相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAからこの耐熱性のRNase H活性を有するタンパク質をコードするDNA（すなわち上記（d）のDNA）を、当業者は容易に選択することができる。

【0017】本発明DNAは、好ましくは配列番号2に示すアミノ酸配列をコードするものであり、さらに好ましくは上記（c）のDNAである。本発明DNAは、2本鎖であっても1本鎖であってもよく、また、RNAと2本鎖を形成してもよい。

【0018】本発明DNAは、本発明により後記実施例に示すようにその塩基配列の一つ（配列番号1）が決定されたので、この配列に基づいて合成することが可能である。また、この塩基配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチドプライマー又はプローブを用いたPCR又はハイブリダイゼーションによって超好熱始原菌染色体DNAから得ることもできる。あるいは、超好熱始原菌のcDNAライブラリーを、上記塩基配列の全部又は一部を有するポリヌクレオチドをプローブとしてスクリーニングすることによっても得ることができる。

【0019】本発明酵素は、本発明DNAがコードする、以下の（a）又は（b）のタンパク質である。

（a）配列番号2のアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）配列番号2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ（a）のタンパク質と同等の耐熱性のRNase H活性を有するタンパク質

【0020】上述のように、この耐熱性のRNase H活性を実質的に害さない1以上のアミノ酸残基の置換、欠失又は置換は当業者であれば容易に選択することができる。

【0021】好ましくは、（b）のタンパク質のアミノ酸配列は、（a）のタンパク質のアミノ酸配列と80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有する。また、本発明酵素には、タンパク質の構造の一部が、自然又は人工の突然変異によって耐熱性のRNase H活性を実質的に変えずに変化した、配列番号2に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドの同種変異型に相当する構造を有するタンパク質も包含される。

【0022】配列番号2のアミノ酸配列は、大腸菌をはじめとする種々の生物由来のRNase HIIのアミノ酸配列とホモロジーを有し、特に、メタン菌(Methanococcus jannaschii)のRNase HIIのアミノ酸配列と38%のホモロジーを有するので、本発明酵素は、RNA

seHIIであると考えられる。

【0023】本発明酵素は、本発明DNAを細胞に導入して形質転換された細胞を得、形質転換された細胞を、好適な培地で培養し、本発明酵素を培養物中に生成蓄積させ、その培養物から該酵素を採取することによって製造することができる。

【0024】本発明DNAの細胞への導入は、公知の発現ベクターに本発明DNAを挿入して組換えプラスミドを構築し、この組換えプラスミドを導入することによって行うことができる。

【0025】細胞及び発現ベクターとしては、外来タンパク質の発現に通常用いられる宿主ベクター系を使用することができ、例としては、大腸菌等の原核細胞とそれに適した発現ベクター（例えば、大腸菌MIC3001株とベクターpJLA503）、哺乳類細胞等の真核細胞とそれに適した発現ベクターの組み合わせが挙げられる。培地や培養条件は、用いる細胞に合わせて適宜選択される。

【0026】本発明酵素は、単独に発現させてもよいし、他のタンパク質との融合タンパク質として発現させてもよい。また、本発明酵素は全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【0027】培養物とは、培地および当該培地中の細胞であり、培養物からの本発明酵素の採取は、上記の本発明酵素の活性等を指標にして、菌体破碎、硫酸分画、陰イオン交換クロマトグラフィーなどの公知のタンパク質の精製手段によって行うことができる。また、本発明酵素は耐熱性であるため、宿主由来のタンパク質等を熱処理により変性させることで精製が容易になるので、精製において熱処理を行うことが好ましい。精製方法の一例としては、培養により得られた細胞を超音波処理により破碎し、得られた抽出液を90℃で15分間熱処理した後、硫酸分画（70%飽和の硫酸で沈殿）を行い、次いでDE-52カラム等を用いる陰イオン交換クロマトグラフィーを行う方法が挙げられる。

【0028】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0029】

【実施例1】耐熱性RNaseHをコードするDNAのクローニング

（1）ショットガンクローニング

超好熱始原菌Pyrococcus sp. KOD1株由来のRNaseHをコードするDNAを取得するために、ショットガンクローニングを行った。ショットガンクローニングの宿主としては、RNaseH依存性温度感受性変異株である大腸菌MIC3001株を用いた。この菌株においてはRNaseHI遺伝子が欠損しておりRecB遺伝子も温度感受性の遺伝子に置き換えられているので、この菌株は30℃では生育するものの42℃では生育できない。しかしながら、42℃でも活性を有するRNaseHやR

ecBタンパク質をコードするDNAを含むプラスミドで形質転換されると、MIC3001株は温度感受性ではなくなり、42℃でも生育可能となる。

【0030】Pyrococcus sp. KOD1株（Gene 166, 139-143(1995)、大阪大学工学部 物質・生命工学専攻 森川正章助教授より恵与）から染色体DNAを調製し、調製した染色体DNAを制限酵素BamHI又はHindIIIで切断した後、得られた断片をpBR322の対応する制限酵素部位に挿入することにより、様々な挿入断片を持つプラスミドの混合物を得た。これらの組換えプラスミドを用いて大腸菌MIC3001株（三菱化学生命科学研究所 主任研究員 板谷光泰氏より恵与）を形質転換した。形質転換体を42℃と30℃とにおいて各々インキュベートし、コロニーの生育数を調べた。その結果、制限酵素としてBamHIを用いた場合に、42℃のプレートに11個のコロニーの生育が見られた。30℃では約5000個のコロニーが生育したので、温度感受性の相補率は約0.2%であった。これらの11個のコロニーからプラスミドを抽出した後、様々な制限酵素による切断パターンを調べた。その結果、得られたコロニーに由来のpBR322に挿入されているDNA断片は、全て同じものでそのサイズは約3kbpであった（以下、これらのプラスミドをpBR3000と呼ぶ）。

【0031】（2）DNAの塩基配列決定

pBR3000に挿入されているDNA断片の塩基配列を決定した。決定された塩基配列及びその塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号1に、アミノ酸配列のみを配列番号2に示す。この塩基配列から予想されるタンパク質のアミノ酸残基数は228、分子量は25799、等電点は5.4である。

【0032】公知のアミノ酸配列に対するホモロジー検索の結果、各種の輸送タンパク質、及び、RNaseHIIと相同性が高いことが判明した。特に、同じ始原菌であるメタン細菌(Methanococcus. jannaschii)においてRNaseHIIと考えられているオープンリーディングフレームの配列と38%のホモロジーを有する。

【0033】

【実施例2】耐熱性リボヌクレアーゼHの製造

（1）大量生産系の構築

実施例1で得られたpBR3000を鋳型DNAとし、NdeIの制限酵素部位を含む5'-プライマー（TTAGGAGGTGAACATATGAAGATAGCGGCATTGACGAGGC（配列番号3）、NdeI部位にアンダーラインを付記）とSalIの制限酵素部位を含む3'-プライマー（GCGGGTCCGACCCTCGCGGCTGCCAGTTTTCAT（配列番号4）、SalI部位にアンダーラインを付記）とにより約720bpのDNA断片をPCR反応により増幅した。PCR反応は市販のGene Amp Kit（Takara）の説明書に従って行った。得られた約720bpのDNA断片を制限酵素NdeIとSalIとで切断した後、消化物を1.0%アガロースゲル電気泳動にかけ、約720bpのDNA断片を切り出し抽

出して精製した。

【0034】次に、このようにして得られたDNA断片を、大腸菌での発現ベクターpJLA503 (Medac社(ドイツ)より購入)にサブクローニングし、発現ベクターを構築した。pJLA503においては、バクテリオファージラムダプロモーターP<sub>R</sub>とP<sub>L</sub>とからの転写が、温度感受性リプレッサーcI<sup>ts857</sup>の制御を受けているので、30~32℃ではこれらのプロモーターの下流に挿入した遺伝子の発現は抑制されるのに対して、40~42℃では遺伝子発現が誘導される。プラスミドpJLA503をNdeIとSalIとで消化し、約4.9kbのDNA断片を0.7%アガロースゲル電気泳動により精製した後、上記約720bpのDNA断片とライゲーションすることにより環化した。ライゲーションは市販のライゲーションキット(Takara)を用い、添付の説明書に従って行った。このようにして得られたプラスミドpJAL700Kで大腸菌MIC3001株を形質転換し、耐熱性リボヌクレアーゼHを大量発現する形質転換体MIC3001/pJAL700Kを得た。

#### 【0035】(2) 精製

大腸菌形質転換体MIC3001/pJAL700Kを、100μg/lのアンピシリンを含むLB培地400 ml中、30℃で振盪培養した。培養液の600 nmにおける吸光度が0.5になった時点で、培養温度を42℃に上げ、更に、4時間振盪培養を続け、次いで遠心して集菌した。得られた菌体を、2 mM EDTAを含む20 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 40 mlに懸濁した後、水中で超音波処理により菌体を破碎した。30,000rpmで30分間遠心して得た遠心上清(粗抽出液)を90℃で15分間熱処理した後、最終濃度が70%飽和となるように硫酸を加え、水中30分間攪拌した後、30,000rpmで30分間遠心して沈殿を集めた。この沈殿を10 mlの5 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に溶かした後、同緩衝液に対して4℃で一晩透析した。その後、同緩衝液で平衡化したDE-52カラムにかけた。本酵素はこの条件ではDE-52カラムを素通りした。素通り画分を1 mM EDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に対し4℃で一晩透析した。その後、同緩衝液で平衡化したDE-52カラムにかけると本

酵素はカラムに吸着したので、NaCl濃度を0.5 Mまで直線的に上昇させることにより、DE-52カラムから耐熱性リボヌクレアーゼHを溶出させた。活性画分を集め、1 mM EDTA及び150 mM NaClを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に対して透析し、精製標品とした。精製標品は15%SDS-PAGEで単一バンドを与えた。精製収量は、20~30 mg/l培養液であった。ゲル透過でも精製標品は単一ピークを与え、推定分子量は34,000であった。この値は、SDS-PAGEから推定される分子量27,000に近いので、本酵素は、単量体(モノマー)として機能することが示唆された。本酵素の活性をトリチウムラベルしたM13-DNA/RNAを基質として37℃で測定したところ、高度好熱菌*Thermus thermophilus* HB8由来のRNase HIと比較して、約50%の比活性を示した。活性測定は公知の方法(J. Biol. Chem. 266, 6038-6044(1991))により行った。

#### 【0036】

【発明の効果】本発明によれば、新規な耐熱性リボヌクレアーゼH及びそれをコードするDNAが提供される。耐熱性リボヌクレアーゼHは、サイクリングアプローブ法用試薬等の遺伝子工学用試薬や診断薬として極めて有用である。

#### 【0037】

##### 【配列表】

配列番号：1  
配列の長さ：867  
配列の型：核酸  
鎖の数：2本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：Genomic DNA  
起源  
生物名：Pyrococcus sp.  
株名：KOD1  
配列の特徴  
特徴を表す記号：CDS  
存在位置：181..867

##### 配列

CGATAGCGCT GATGGTAAGT TCTGACTTCA GGAAGTTCT CGGAATAAGT CTACTCCTAA	60
CTCTGACCGT CCAGCTTACC TCAGTGGTTC TTGCCTACTT CACCGCCATA CCCCCAAGTG	120
GTATAGCCAC GATAATGCTG GGCATTGTCT ATGGTGCCTT CTTATTTAGG AGGTGAACCA	180
ATG AAG ATA GCG GGC ATT GAC GAG GCC GGG AGG GGG CCA GTT ATC GGA	228
Met Lys Ile Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly	
1 5 10 15	
CCA ATG GTG ATA GCG GCG GTT GTG GTG GAT GAG AAT AGC CTC CCA AAG	276
Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys	
20 25 30	
CTC GAA GAA CTG AAG GTC AGG GAC TCT AAA AAA CTG ACA CCA AAG AGA	324
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg	
35 40 45	
CGG GAG AAG CTT TTC AAT GAA ATA CTC GGA GTT TTA GAT GAT TAT GTA	372

```

Arg Glu Lys Leu Phe Asn Glu Ile Leu Gly Val Leu Asp Asp Tyr Val
  50                      55                      60
ATT CTT GAA TTG CCT CCC GAT GTC ATT GGT TCC AGG GAG GGC ACG CTC    420
Ile Leu Glu Leu Pro Pro Asp Val Ile Gly Ser Arg Glu Gly Thr Leu
  65                      70                      75                      80
AAC GAG TTC GAG GTT GAG AAC TTC GCG AAG GCC CTG AAC TCG CTC AAG    468
Asn Glu Phe Glu Val Glu Asn Phe Ala Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys
      85                      90                      95
GTA AAG CCC GAT GTA ATC TAC GCT GAC GCG GCT GAC GTT GAC GAG GAA    516
Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu
      100                      105                      110
CGC TTT GCG AGA GAG CTT GGG GAG AGG CTG AAC TTC GAG GCT GAA GTC    564
Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val
      115                      120                      125
GTT GCG AAG CAC AAG GCC GAC GAC ATC TTT CCC GTC GTC TCA GCT GCT    612
Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala
      130                      135                      140
TCA ATC CTC GCC AAG GTT ACA AGG GAC AGG GCG GTT GAA AAG CTC AAA    660
Ser Ile Leu Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Ala Val Glu Lys Leu Lys
      145                      150                      155                      160
GAA GAG TAC GGG GAG ATA GGC TCT GGC TAC CCA AGC GAC CCA AGA ACG    708
Glu Glu Tyr Gly Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr
      165                      170                      175
AGG GCT TTT CTT GAG AAC TAT TAT CGG GAG CAC GGT GAG TTT CCG CCG    756
Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro
      180                      185                      190
ATA GTT AGG AAG GGC TGG AAG ACG CTG AAG AAG ATA GCA GAA AAA GTT    804
Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val
      195                      200                      205
GAG AGC GAG AAA AAG GCC GAA GAA AGG CAG GCT ACT CTT GAC CGC TAC    852
Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr
      210                      215                      220
TTT CGG AAG GTC TGA    867
Phe Arg Lys Val
225

```

【 0 0 3 8 】 配列番号 : 2

配列の長さ : 228

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

```

Met Lys Ile Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gly Arg Gly Pro Val Ile Gly
  1                      5                      10                      15
Pro Met Val Ile Ala Ala Val Val Val Asp Glu Asn Ser Leu Pro Lys
      20                      25                      30
Leu Glu Glu Leu Lys Val Arg Asp Ser Lys Lys Leu Thr Pro Lys Arg
      35                      40                      45
Arg Glu Lys Leu Phe Asn Glu Ile Leu Gly Val Leu Asp Asp Tyr Val
      50                      55                      60
Ile Leu Glu Leu Pro Pro Asp Val Ile Gly Ser Arg Glu Gly Thr Leu
      65                      70                      75                      80
Asn Glu Phe Glu Val Glu Asn Phe Ala Lys Ala Leu Asn Ser Leu Lys

```

85 90 95  
 Val Lys Pro Asp Val Ile Tyr Ala Asp Ala Ala Asp Val Asp Glu Glu  
 100 105 110  
 Arg Phe Ala Arg Glu Leu Gly Glu Arg Leu Asn Phe Glu Ala Glu Val  
 115 120 125  
 Val Ala Lys His Lys Ala Asp Asp Ile Phe Pro Val Val Ser Ala Ala  
 130 135 140  
 Ser Ile Leu Ala Lys Val Thr Arg Asp Arg Ala Val Glu Lys Leu Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Glu Tyr Gly Glu Ile Gly Ser Gly Tyr Pro Ser Asp Pro Arg Thr  
 165 170 175  
 Arg Ala Phe Leu Glu Asn Tyr Tyr Arg Glu His Gly Glu Phe Pro Pro  
 180 185 190  
 Ile Val Arg Lys Gly Trp Lys Thr Leu Lys Lys Ile Ala Glu Lys Val  
 195 200 205  
 Glu Ser Glu Lys Lys Ala Glu Glu Arg Gln Ala Thr Leu Asp Arg Tyr  
 210 215 220  
 Phe Arg Lys Val  
 225

【0039】配列番号：3

配列の長さ：41

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TTAGGAGGTG AACATATGAA GATAGCGGGC ATTGACGAGG C

41

【0040】配列番号：4

配列の長さ：34

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GCGCGGTCGA CCCTGCGGGC TGCCAGTTTT GCAT

34

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup> ... 識別記号

(C12N 9/22

C12R 1:19)

F I